

**PCT**ORGANISATION MONDIALE  
Bureaux

WO 9602571A1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C07K 14/75, A61L 2/18, A61K 38/36		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/02571 (43) Date de publication internationale: 1er février 1996 (01.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE95/00069 (22) Date de dépôt international: 14 juillet 1995 (14.07.95) (30) Données relatives à la priorité: 94870121.4 14 juillet 1994 (14.07.94) EP (34) Pays pour lesquels la demande régionale ou internationale a été déposée: BE etc. (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CROIX-ROUGE DE BELGIQUE [BE/BE]; Dept. Central de Fractionnement, 5, rue Joseph-Stallært, B-1060 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LAUB, Ruth [BE/BE]; 6, avenue Besme, B-1190 Bruxelles (BE). DE Wael, Luc [BE/BE]; Herentalsebaan 65, B-2520 Ranst (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, 6/1, place Reine-Fabiola, B-1080 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: CONCENTRATE OF FIBRINOGENE OBTAINED FROM BLOOD PLASMA, PROCESS AND PLANT FOR ITS PREPARATION (54) Titre: CONCENTRE DE FIBRINOGENE ISSU DE PLASMA SANGUIN, PROCEDE ET INSTALLATION POUR SA PREPARATION (57) Abstract The present invention relates to a fibrinogen concentrate which is characterized in that it is free of viral contaminants and in that its purity is higher than 95 %. The present invention also relates to the process for obtaining such fibrinogen concentrate. (57) Abrégé La présente invention concerne un concentré de fibrinogène caractérisé en ce qu'il est dépourvu de contaminants viraux et en ce que sa pureté est supérieure à 95 %. La présente invention concerne également le procédé d'obtention dudit concentré de fibrinogène.			

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

10     CONCENTRE DE FIBRINOGENE ISSU DE PLASMA SANGUIN. PROCEDE  
          ET INSTALLATION POUR SA PREPARATION.

Objet de l'invention.

          La présente invention concerne un concentré de  
15     fibrinogène issu du plasma sanguin humain ou animal et son  
procédé de préparation, ainsi que l'installation pour la  
préparation dudit concentré de fibrinogène.

          La présente invention concerne également la  
composition pharmaceutique et/ou cosmétique comprenant ledit  
20     concentré de fibrinogène.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention.

          Le fibrinogène est une protéine plasmatique d'une  
importance capitale dans le processus de coagulation, et ses  
champs d'application pharmaceutique ou cosmétique recouvrent  
25     différents domaines (cicatrisation de plaies, agent de  
coagulation, constituant de colles biologiques, fibrogénémie,  
inhibition de conséquences opératoires et post-opératoires,  
...).

          La mise à disposition de protéines du sang, telles  
30     que le fibrinogène, nécessite pour leur utilisation à des  
fins thérapeutiques ou non thérapeutiques des techniques de  
purification permettant d'obtenir des produits de haute  
pureté et totalement dépourvus de contaminants viraux (HIV,  
hépatites, parvovirus, ...) ou de molécules biologiques  
35     telles que des anticorps ou des protéases (Council Directive  
65/65 EEC, 75/319/EEC & 89/381 EEC).

Aussi, différents procédés de traitement (filtration, précipitation, chromatographie d'affinité, ...) ont été proposés pour éliminer ou inactiver les contaminants du plasma et/ou de composés dérivés du plasma (facteur VIII, 5 facteur de von Willebrand, fibronectine, ...).

Les traitements d'inactivation virale peuvent consister en un traitement thermique ou chimique.

Un traitement chimique peut par exemple consister en une inactivation virale par solvant-détergent telle que 10 décrite dans la demande de brevet numéro EP-0 131 740.

Cependant, ces traitements thermiques ou chimiques d'inactivation virale ne permettent pas d'éliminer complètement certains contaminants viraux, en particulier certains virus non enveloppés tels que le parvovirus B19.

#### 15 Etat de la technique.

La demande de brevet PCT/FR89/00050 (WO89/12065) décrit une telle inactivation virale par solvant-détergent dans un procédé de séparation de protéines du plasma à partir d'une fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma.

20 Selon ce procédé, on soumet la fraction d'un cryoprécipité de plasma resolubilisée dans l'eau à un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent, puis à une séparation unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'anions dont la matrice est un gel capable, de 25 par ses propriétés de porosité et d'hydrophobicité, de retenir le complexe facteur VIII - facteur de von Willebrand. On récupère ensuite sélectivement chacune des protéines par des augmentations successives de la force ionique du tampon d'élution.

30 Le premier filtrat de la chromatographie contient principalement du fibrinogène, mais aussi de l'albumine, des immunoglobulines et les agents d'inactivation virale (Tween et TNBP).

A partir de cette solution, le fibrinogène est 35 ensuite purifié (élimination des agents d'inactivation virale) par une nouvelle étape de chromatographie sur colonne

de résine d'héparine-sépharose.

La fraction de fibrinogène recueillie est ensuite concentrée et dialysée par un système de cassette. Le produit concentré est réparti en flacons et lyophilisé.

5           Cependant, cette technique de purification du fibrinogène présente l'inconvénient qu'elle nécessite une étape de purification complexe et coûteuse par chromatographie.

10           En outre, cette technique de purification ne permet pas de traiter industriellement de manière rapide des volumes importants de fractions enrichies en fibrinogène de haute pureté. De même, le concentré de fibrinogène purifié par une étape supplémentaire de chromatographie sera dépourvu de facteur XIII, ce qui réduirait son application en tant que  
15 colle biologique.

          Les brevets et demandes de brevet DE-30 01 435, EP-0 311 950 et PCT/GB86/00121 (WO86/05190) décrivent des procédés de purification de composés sanguins issus de fractions de plasma sanguin par précipitation à pH acide et  
20 en présence d'un acide aminé.

De tels procédés peuvent être combinés à un procédé chimique d'inactivation virale.

Néanmoins, les produits obtenus par les différentes techniques citées ne sont pas suffisamment purs.

25           En effet, des contaminants tels que des protéases ne sont pas éliminés par ces techniques.

De plus, le concentré de fibrinogène non délipidé obtenu ne peut être rendu soluble que très lentement.

#### Buts de l'invention.

30           La présente invention vise à obtenir un concentré de fibrinogène hautement purifié, dépourvu de contaminants viraux (enveloppés et/ou non enveloppés) et de molécules biologiques telles que des protéases.

          Un autre but de la présente invention est d'obtenir  
35 un concentré de fibrinogène qui soit aisément solubilisable, de préférence en moins de 10 minutes.

Un but complémentaire de la présente invention est d'obtenir également un concentré de fibrinogène non dépourvu de facteur XIII, de manière à garantir son application en tant que colle biologique.

5 La présente invention vise également à obtenir un procédé d'obtention de ce concentré de fibrinogène issu de plasma sanguin, qui ne présente pas les inconvénients de l'état de la technique citée, en particulier un procédé qui soit simple, rapide et peu coûteux, et qui permette d'obtenir  
10 de manière industrielle des volumes importants de fibrinogène hautement purifié.

Eléments caractéristiques de l'invention.

La Demanderesse a réussi à isoler un concentré de fibrinogène qui est dépourvu de tous les contaminants viraux  
15 connus à ce jour, à savoir les virus enveloppés et non enveloppés connus, en particulier les virus de l'hépatite A, de l'hépatite B et de l'hépatite C, les virus HIV et les parvovirus (en particulier le parvovirus B19).

En outre, ledit concentré de fibrinogène est  
20 caractérisé par une pureté particulièrement élevée, supérieure à 95%, voire supérieure à 98%. La fraction restante dans ce concentré de fibrinogène est constituée de facteur XIII (la proportion du facteur XIII dans la fraction restante pouvant être supérieure à 30%) et  
25 d'immunoglobulines.

En outre, il peut également subsister dans ce concentré de fibrinogène une très faible concentration d'additifs chimiques (solvants / détergents) utilisés dans le procédé d'inactivation chimique de ce concentré de  
30 fibrinogène.

Cependant, les solvants / détergents détectés dans le produit final ne sont présents qu'à l'état de traces, non toxiques.

Avantageusement, ledit concentré de fibrinogène est  
35 également dépourvu de protéases.

Avantageusement, ledit concentré de fibrinogène selon l'invention est délipidé, c'est-à-dire qu'il peut être rapidement et aisément solubilisé en quelques minutes, de préférence en moins de 15 minutes, voire moins de 10 minutes.

5 En outre, le concentré de fibrinogène ne subit pas de coagulation après conservation pendant plus de 12 mois à 4° C.

Préférentiellement, ledit concentré de fibrinogène comporte plus de 0,001%, de préférence plus de 0,1%, de  
10 facteur XIII.

La présente invention concerne également le procédé d'obtention du concentré de fibrinogène dans lequel on soumet une fraction solubilisée de plasma contenant du fibrinogène à un traitement chimique d'inactivation virale,  
15 à une ou plusieurs étape(s) de précipitation dans une solution à un pH acide et comprenant un acide aminé (et éventuellement à un ou plusieurs traitement(s) physique(s) (traitements par rayonnement ultraviolet, en particulier UVC) ou thermique(s) d'inactivation virale).

20 La combinaison de ces différentes étapes permet, de manière inattendue, d'obtenir par un effet synergique le concentré de fibrinogène selon l'invention, dont la pureté est supérieure à 95 % et qui est dépourvu de contaminants viraux.

25 Avantageusement, l'étape de précipitation à pH acide s'effectue à un pH compris entre 4.0 et 7.0, de préférence entre 5.5 et 6.5.

La concentration en acide aminé (de préférence la Glycine) dans la solution est comprise entre 0.1 et 3.3  
30 molaire, de préférence entre 0.5 et 1.5 molaire.

En outre, le procédé de purification comporte, de préférence après chaque étape de précipitation, une ou plusieurs étape(s) de filtration du fibrinogène purifié. Préférentiellement, cette étape de filtration s'effectue sur  
35 filtre de carbone activé.

Les filtres carbone AKS-4 ou AKS-7, tels que ceux fournis par la société ZEISS, conviennent particulièrement au procédé de l'invention.

5 Selon l'invention, le traitement chimique d'inactivation virale consiste en un traitement par solvant-détergent tel que décrit dans la demande de brevet EP-0 131 740.

10 L'étape thermique d'inactivation virale s'effectue par exemple par chauffage à une température supérieure à 80 °C, pendant une durée supérieure ou égale à 10 heures, de préférence comprise entre 24 et 72 heures.

15 L'étape physique d'inactivation virale s'effectue par traitement de la fraction solubilisée de plasma aux rayons ultraviolets C, dont la longueur d'onde est comprise entre 250 et 270 nm, de préférence de l'ordre de 254 nm, et les doses d'irradiation sont de l'ordre de 250 Joules/m<sup>2</sup>.

20 Selon l'invention, la fraction solubilisée de plasma est choisie parmi le groupe constitué par la fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma, la fraction FI de Cohn et/ou un mélange d'entre elles.

Selon une première forme d'exécution préférée de l'invention, on soumet préalablement la fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'ions.

25 De préférence, la résine échangeuse d'ions comporte une matrice constituée d'un gel capable, de par ses propriétés de porosité et d'hydrophobicité, de retenir le complexe facteur VIII - facteur de von Willebrand présent dans le plasma.

30 En outre, selon cette forme d'exécution préférée de l'invention, le procédé comporte également une étape dans laquelle on soumet préalablement la fraction solubilisée du cryoprécipité de plasma à un traitement de prépurification comprenant un traitement à l'hydroxyde d'alumine et/ou une  
35 précipitation à une température comprise entre 10 et 20 °C.



La présente invention concerne également la composition pharmaceutique et/ou cosmétique comprenant le concentré de fibrinogène selon l'invention et/ou obtenu par le procédé d'obtention selon l'invention.

5 En particulier, cette composition pharmaceutique et/ou cosmétique est une colle biologique telle que décrite dans la demande de brevet EP-0 305 243 et comprenant le concentré de fibrinogène selon l'invention.

10 Un dernier aspect de la présente invention concerne l'installation pour la préparation d'un dérivé sanguin, en particulier d'un concentré de fibrinogène, d'une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou d'une colle biologique selon l'invention. Ladite installation comporte un dispositif assurant une inactivation virale physique de la fraction  
15 solubilisée du plasma selon le procédé de l'invention.

En particulier, le dispositif de l'installation de l'invention comporte un émetteur de rayons UVC dont la longueur d'onde est comprise entre 250 et 270 nm, de préférence de l'ordre de 254 nm, l'émetteur émettant à des  
20 doses d'irradiation de l'ordre de 250 Joules/m<sup>2</sup>.

#### Brève description des figures.

La figure 1 représente l'analyse densimétrique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) du fibrinogène purifié par différentes  
25 méthodes.

Les figures 2 à 5 représentent l'analyse zymographique du fibrinogène purifié par différentes méthodes.

La figure 6 représente de manière schématique une installation pour la préparation du concentré de fibrinogène selon l'invention.  
30

La présente invention sera décrite de manière plus détaillée en référence aux figures annexées dans les exemples  
35 suivants donnés à titre d'illustration non limitative de l'invention.

Exemple 1.

On utilise comme matériau de départ un cryoprécipité de plasma comprenant du fibrinogène remis en suspension.

- 5            Cette suspension de cryoprécipité est soumise à une prépurification par traitement à l'hydroxyde d'alumine et une précipitation à froid.

10           Cette solution prépurifiée est soumise ensuite à un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent telle que décrite dans la demande de brevet européen EP-0 131 740.

15           Cette fraction solubilisée est ensuite soumise à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'ions et on récupère sélectivement la première fraction obtenue (éluat + volume de lavage) qui est purifiée par une première étape de précipitation dans les conditions suivantes:

- température = 25 °C
- 20   - Na citrate 0,15 M, NaCl 0,15 M, Glycine 1 M
- pH 6,1 (HCl 1 normal)
- Glycine 1 M.

Ensuite, on porte la température à +4 °C et on effectue une centrifugation.

- 25           On redissout le précipité dans les conditions suivantes:

- pH 7.0
- température = 30 °C
- Na citrate 0,15 M, NaCl 0,15 M, Glycine 1 M
- 30   - filtration AKS-4 - AKS-7
- pH 6,1 (HCl 1 normal).

On reporte ensuite la température à +4 °C et on effectue une centrifugation.

35           Le précipité est redissout dans les conditions suivantes:

- température = 30 °C
- Na citrate 0.05 M, monodextrose 50 g/l
- NaCl 0.05 M
- pH 7.

5 Le précipité est ensuite filtré sur un filtre de carbone du type AKS4-EKSP ® (SEITZ), puis concentré et diafiltré. Le produit concentré est ensuite stérifiltré après ajout stabilisateur (sucrose), mis en flacons et lyophilisé.

10 Les rendements obtenus selon le procédé de l'invention sont de l'ordre de 80% et la pureté des produits atteint des valeurs de l'ordre de 98% ± 2%.

#### Exemple 2.

15 On utilise, comme dans l'exemple 1, comme matériau de départ, un cryoprécipité de plasma soumis à un traitement chimique d'inactivation virale par solvant-détergent; mais sans soumettre le cryoprécipité à une étape de prépurification par chromatographie comme dans l'exemple 1.

20 La purification du fibrinogène est obtenue par une seule étape de précipitation. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 70 à 80% et la pureté des produits atteint des valeurs de l'ordre de 75 à 85%.

25 Le tableau 1 ci-dessous reprend les données comparatives de différentes méthodes de purification du fibrinogène.

Tableau 1.

	Rendement global %	Pureté % (e)	Tween 80 ppm (f)	TNBP ppm (g)	Protéases (h)
30 Méthode I (a)	70 - 80	> 98	< 10	< 1	-
Méthode II (b)	70 - 80	75 - 85	125	< 20	++
Méthode III (c)	> 90	> 90	82	< 10	±
35 Méthode IV (d)	nd	70 - 80	nd	nd	++

- 5 (a) Le fibrinogène est purifié à partir de la première fraction obtenue sélectivement à partir d'une étape unique de chromatographie, suivie de 2 précipitations à la Glycine et filtration sur filtre AKS4-EKSP ③ (exemple 1).
- (b) Le fibrinogène est purifié à partir d'un cryoprécipité de plasma non prétraité par chromatographie et purifié par une seule précipitation (exemple 2).
- 10 (c) Le procédé est identique au procédé (a) mais ne comporte qu'une seule précipitation à la Glycine.
- (d) Le fibrinogène est purifié selon le procédé décrit dans la demande de brevet PCT/FR89/00050.
- (e) Analyse densitométrique du gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, voir figure 1).
- 15 (f) La limite supérieure acceptable de la concentration du Tween 80 doit être inférieure à 100 ppm.
- (g) La limite supérieure acceptable de la concentration du TNBP doit être inférieure à 10 ppm.
- (h) La présence de protéases a été mise en évidence par  
20 analyse zymographique (voir figure 2).

L'analyse densitométrique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) de la figure 1 reprend différents lots de fibrinogènes obtenus par différents procédés selon  
25 l'invention et selon l'état de la technique.

Quantité de matériel déposé par piste : 5 µg protéine

- Pistes 1,8 : standards de poids moléculaires BIO-RAD ③  
"High range"
- 30 - Piste 2 : mise en solution du cryoprécipité
- Piste 3 : fibrinogène standard de chez Kordia ③
- Piste 4 : fibrinogène préparé à partir du cryoprécipité (2 précipitations à la Glycine)
- Piste 5 : fibrinogène préparé à partir du pic A d'une  
35 colonne échangeuse d'ions (1 précipitation à la Glycine)

11

- Piste 6 : fibrinogène préparé à partir du pic A d'une colonne échangeuse d'ions (2 précipitations à la Glycine)
- Piste 7 : fibrinogène préparé à partir d'une colonne Héparine-Sépharose (Pharmacia)

Les pistes 2, 3, 4 et 7 comportent une bande supplémentaire (MW 300.000) de fibronectine.

L'analyse zymographique présentée aux figures 2 à 5 reprend l'analyse de différents lots de fibrinogène obtenus par différents procédés selon l'invention et selon l'état de la technique (sur gélatine (figure 2), sur gélatine + EDTA (figure 3), sur caséine (figure 4), sur caséine + EDTA (figure 5)).

15

Quantité de matériel déposé par piste : 500 µg protéine

- Pistes 1,8 : standards de poids moléculaires BIO-RAD ® "High range"
- Piste 2 : mise en solution du cryoprécipité
- Piste 3 : fibrinogène standard de chez Kordia ®
- Piste 4 : fibrinogène préparé à partir du cryoprécipité (2 précipitations à la Glycine)
- Piste 5 : fibrinogène préparé à partir du pic A d'une colonne échangeuse d'ions (1 précipitation à la Glycine)
- Piste 6 : fibrinogène préparé à partir du pic A d'une colonne échangeuse d'ions (2 précipitations à la Glycine)
- Piste 7 : fibrinogène préparé à partir d'une colonne Héparine-Sépharose (Pharmacia)

Les pistes 2 et 7 indiquent clairement la présence de protéases.

35

Exemple 3 : Préparation de concentré de fibrinogène à partir de la fraction FI (fractionnement de Cohn (voir tableaux 2 et 3)).

Obtention de la fraction FI.

5 50 l de plasma sont décongelés à  $0 \pm 2$  °C et centrifugés pour obtenir le cryoprécipité. Le pH du plasma pauvre en cryoprécipité est amené à pH 7.2 avec du HCl et est additionné par de l'éthanol ( $9 \pm 1\%$ ). La température est maintenue à  $-2,5$  °C. Après deux heures d'incubation, la  
10 suspension est centrifugée et un culot (Fraction I de Cohn ou FI) est obtenu ( $\pm 800$  g).

La fraction FI est resuspendue dans du tampon citrate (citrate Na 0,15 M - NaCl 0,15 M - pH  $7.0 \pm 0.1$ ) à 15 °C. De l'alhydrogel (2% concentration finale) est ajouté,  
15 et l'incubation se poursuit 20 minutes à 22 °C. Après élimination du culot riche en protéases, le surnageant est filtré sur filtre clarifiant (1 µm Pall) avec un débit de 1 l/m. Une première inactivation virale est menée par addition de solvant-détergent (8 heures en présence de  
20 Tween 80 1% et de TNBP 0,3% à 25 °C).

Première précipitation à la Glycine.

Après inactivation, le PH est ajusté à  $6.1 \pm 0.1$  et la concentration en Glycine est amenée à 1 M. Après minimum 2 heures de précipitation à 4 °C, la suspension est  
25 centrifugée ou décantée. Le culot est dissous dans 10 fois son volume en tampon citrate à 30°C et le pH est ramené à  $7.0 \pm 0.1$ .

Élimination du solvant-détergent par filtration absorptive clarifiante.

30 La suspension est filtrée sur charbon de type AKS-4 ou AKS-7 (3 plaques) et filtre de type Kieselguhr EKSP (3 plaque) (débit 700 ml/min).

L'élimination du solvant-détergent est plus efficace sur les filtres charbon AKS-4 ou AKS-7 tels que ceux  
35 fournis par la société ZEISS que sur les filtres "delipided" tels que ceux fournis par la société CUNO.

Seconde précipitation à la Glycine.

Le pH du filtrat est ramené à  $6.1 \pm 0.1$ , et la Glycine est additionnée (concentration finale 1 M). La précipitation à 4 °C dure minimum 2,5 heures. Le précipité  
5 est obtenu après centrifugation ou décantation.

Seconde filtration clarifiante.

Le culot est dissous dans du tampon citrate 3 fois dilué et filtré, comme précédemment décrit.

Concentration et diafiltration.

10 Le filtrat de la seconde filtration est concentré par ultrafiltration (Filtron ®, Millipore) ("clotting assay") et diafiltré contre du tampon citrate 3 fois dilué.

Addition des stabilisateurs et seconde inactivation virale par les rayons ultraviolets.

15 Des stabilisateurs sont additionnés au fibrinogène purifié, le pH est ajusté à  $7.0 \pm 0.1$  et la solution de fibrinogène peut être traitée par des rayons UVC pour pouvoir inactiver notamment les virus non enveloppés (parvovirus B19, virus de l'hépatite A et C, ...).

20 Filtration stérilisante.

La solution est filtrée stérilement sur filtre Millidisk ® 0,45 µm et 0,22 µm (Millipore).

Lyophilisation et traitement thermique sévère.

Après lyophilisation, le fibrinogène peut être  
25 chauffé à 80 °C pendant une durée supérieure ou égale à 10 heures, de préférence pendant une durée comprise entre 24 et 72 heures.

Résultats.

Le produit obtenu est caractérisé par les  
30 propriétés suivantes :

- rendement : 0,4 à 1 g/l de plasma de départ (fraction FI)
- effluent : 0,2 mg/l de plasma
- pureté : supérieure à 98%
- haute concentration en facteur VIII (même après chauffage  
35 à sec sévère)

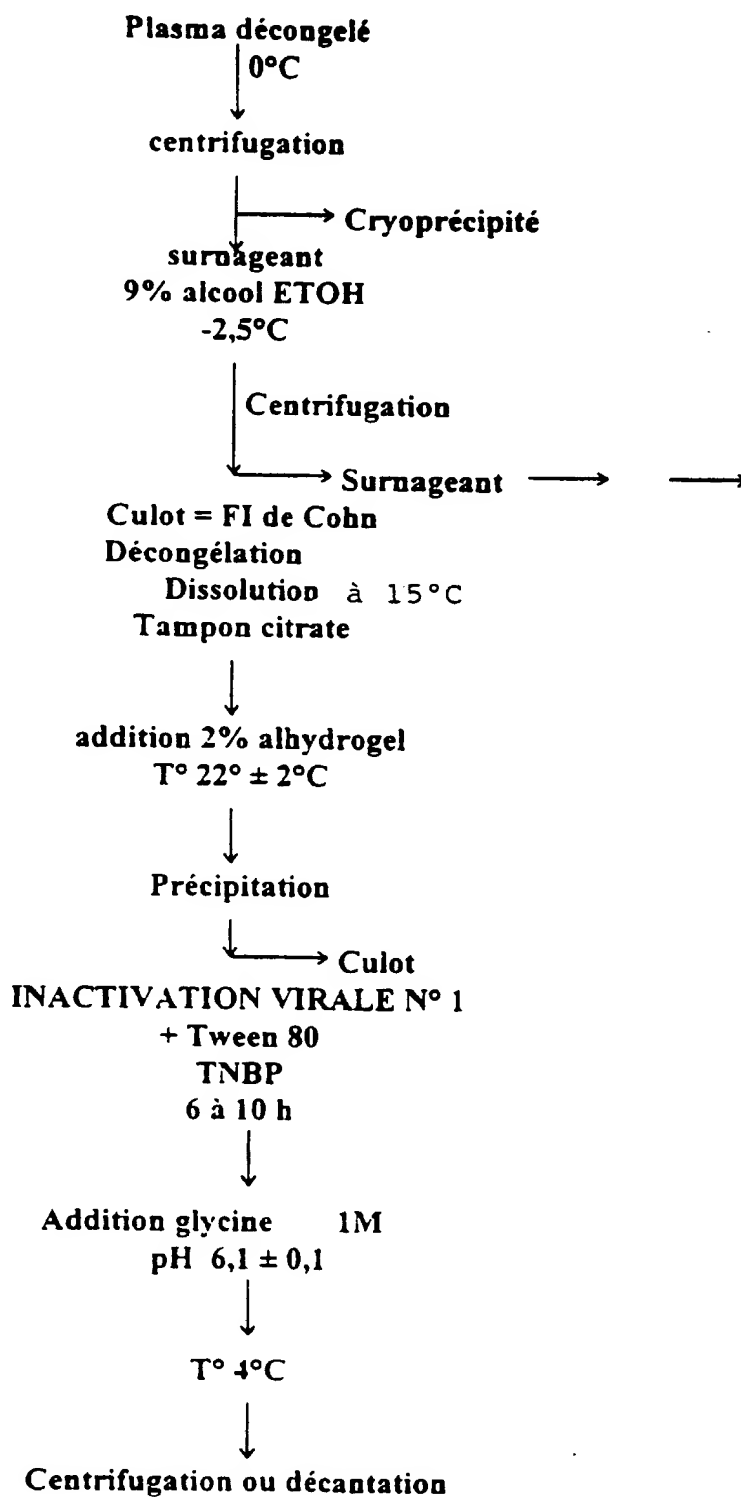
14

- absence de protéases (notamment de protéases dépendantes de la vitamine K) mesurables
- produit soluble en moins de 10 minutes
- produit caractérisé par une très grande stabilité en solution : pas de coagulation après conservation pendant plus de 12 mois à 4 °C
- très bas coût de production
- faible réduction de l'activité du fibrinogène ayant subi trois inactivations virales

10



15

Tableau 2.

16

Tableau 3.**Le culot est mis en solution.****Tampon citrate**↓  
**Filtration****AKS4****EKSP****PH 7.0 ± 0.1**↓  
**Filtrat + glycine 1M**  
**pH 6,1****T° -> 4°C**↓  
**Centrifugation****Décantation** →↓  
**Culot dissous**[ **Citrate Na 0,05 M****NaCl 0,05 M**[ **pH 7,0 ± 0,1**↓  
**Filtration****AKS-4 - EKSP**↓  
**Concentration****et dialyse****INACTIVATION VIRALE N° 2**↓  
**Addition stabilisateurs**

UVC ⚡

↓  
**Filtration stérile**↓  
**lyophilisation**↓  
**INACTIVATION VIRALE N° 3****Chauffage sévère (DH)**

Installation pour la préparation du concentré de fibrinogène selon l'invention.

La figure 6 annexée représente de manière schématique une installation pour la préparation du concentré de fibrinogène selon l'invention.

Cette installation comprend des dispositifs (1 et 2) assurant la précipitation, la centrifugation/décantation, filtration, concentration et dialyse du concentré de fibrinogène selon l'invention et adaptable par l'homme du métier en fonction du dérivé sanguin traité.

En outre, cette installation comporte un dispositif (portant le repère de référence 3 dans la figure 6 annexée) assurant par un traitement physique une inactivation virale du dérivé sanguin.

L'installation selon la présente invention peut donc être utilisée pour un traitement physique d'inactivation virale de tout dérivé sanguin, en particulier celle des facteurs de coagulation (facteur VIII, facteur IX, ...), des immunoglobulines, de l'albumine, du fibrinogène, ... .

Ce dispositif comprend un tube de désinfection UV dont plus de 90% de l'émission s'effectue entre 250 et 270 nm, de préférence à 254 nm, et qui est monté dans une enceinte réfléchissante qui renvoie le rayonnement vers un tube en quartz ou en matériau polymérisé et non absorbant dans cette zone de longueur d'onde. Aucun contact n'est possible entre le produit circulant dans le tube 4 et la lampe UV 5.

Un système de turbulence, tel qu'une baffle ou une injection d'azote, permet de maintenir un flux homogène dans le tube. Le système de contrôle de la quantité d'UV qui irradie le tube est placé du côté opposé du tube par rapport à la lampe. Le temps de maintien du produit peut être ajusté pour obtenir une dose constante d'irradiation. Le diamètre du tube peut être adapté au volume à traiter ainsi que la puissance ou la longueur de la lampe de désinfection. La température est contrôlée et enregistrée tant à l'intérieur de l'enceinte que dans le liquide.

Tout le système est en matériaux en accord avec les bonnes pratiques de production pharmaceutique (GMP), comme de l'inox 304, du Téflon, ..., et peut être traité de manière sanitaire sur place.

5 L'utilisation d'un tel système de rayonnement UV, en particulier de rayonnement UVC, permet d'inactiver les virus, notamment les virus non enveloppés, en particulier les virus simple brin tels que le parvovirus murin (5 à 6 log d'inactivation virale).

10 Le système est placé en aval du procédé de préparation du dérivé sanguin, par exemple avant la filtration stérilisante ou après l'ultrafiltration.

La puissance de la lampe UV est comprise entre 18 et 132 Watts. L'activité des préparations (facteur VIII, 15 fibrinogène et IgG) utilisées est peu affectée (5% en moyenne de réduction d'activité).

Le dispositif peut être construit d'un seul tenant ou en modules juxtaposés placés en série. Les doses d'irradiation varient entre 100 et 2000 Joules/m<sup>2</sup>, mais sont 20 de préférence de l'ordre de 250 Joules/m<sup>2</sup>.

Le dispositif de désinfection UV utilisé dans l'installation selon l'invention est de type s.p.1 (AQUAFINE ®, Valencia, CA (USA)).

25 Exemple 5 : Analyse du concentré de fibrinogène selon l'invention.

Le tableau 4 donne une analyse des caractéristiques du concentré de fibrinogène préparé à partir d'une fraction solubilisée de plasma constituée par la fraction solubilisée 30 d'un cryoprécipité de plasma soumis à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'ions (effluent chromato), éventuellement traitée par un chauffage sévère (effluent chromato DH) ou obtenue par le traitement de la fraction I de Cohn (FI), éventuellement traitée par un 35 chauffage sévère (FI DH).

Cette analyse montre que le produit obtenu présente une pureté particulièrement élevée, supérieure à 98%, présente de très faibles proportions de solvants / détergents, mais conserve une fraction importante de facteur  
 5 XIII assurant l'application du concentré de fibrinogène selon l'invention en tant que colle biologique.

Tableau 4.

	Fraction de départ	Pureté (%)	mg FXIII/l	ppm Tween 80	ppm TNBP
10	Effluent chromat	>98	35	13	<0,5
	Effluent chromat DH	>98	0,7	17	<0,5
	FI	>98	360	<10	<0,5
15	FI DH	>98	103	<10	<0,5

DH : dry heat = chauffage sévère

REVENDICATIONS.

1. Concentré de fibrinogène, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de contaminants viraux et en ce que sa pureté est supérieure à 95 %.
- 5 2. Concentré de fibrinogène selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa pureté est supérieure à 98 %.
3. Concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de protéases.
- 10 4. Concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est délipidé.
5. Concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il ne  
15 subit pas de coagulation après conservation pendant plus de 12 mois à une température de 4 °C.
6. Procédé d'obtention du concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on soumet une fraction solubilisée  
20 de plasma comprenant du fibrinogène à un traitement chimique d'inactivation virale et à une ou plusieurs étape(s) de précipitation dans une solution comprenant un acide aminé et à pH acide.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé  
25 en ce que le pH de la solution est compris entre 4.0 et 7.0, de préférence entre 5.5 et 6.5.
8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la concentration en acide aminé dans la solution est comprise entre 0.1 et 3.3 molaire, de  
30 préférence entre 0.5 et 1.5 molaire.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 8, caractérisé en ce que l'acide aminé est la Glycine.
10. Procédé selon l'une quelconque des  
35 revendications précédentes 6 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte, de préférence après chaque étape de précipitation,

une ou plusieurs étape(s) de filtration du fibrinogène purifié.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape de filtration s'effectue sur filtre de  
5 carbone activé.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 11, caractérisé en ce que le traitement chimique d'inactivation virale consiste en un traitement par addition de solvant-détergent.

10 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte également une étape thermique d'inactivation virale, de préférence par chauffage de la fraction solubilisée de plasma à une température supérieure ou égale à 80 °C, pendant  
15 une durée supérieure ou égale à 10 heures.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte également une étape physique d'inactivation virale par traitement de la fraction solubilisée de plasma au rayons  
20 ultraviolets C.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la majorité de l'émission du rayonnement UVC s'effectue entre 250 et 270 nm et que les doses d'irradiation sont de l'ordre de 250 Joules/m<sup>2</sup>.

25 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 15, caractérisé en ce que la fraction solubilisée du plasma est choisie parmi le groupe constitué par la fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma, la fraction FI de Cohn et/ou un mélange d'entre  
30 elles.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la fraction solubilisée de cryoprécipité de plasma est préalablement soumise à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'ions.

35 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la résine échangeuse d'ions comporte une matrice

constituée d'un gel capable de par ses propriétés de porosité et d'hydrophobicité de retenir le complexe facteur VIII - facteur de von Willebrand.

19. Procédé selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que l'on soumet préalablement la fraction solubilisée du cryoprécipité de plasma à un traitement de prépurification comprenant un traitement à l'hydroxyde d'alumine et/ou une précipitation à une température comprise entre 10 et 20 °C.

20. Composition pharmaceutique et/ou cosmétique comprenant le concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou obtenue selon le procédé de l'une quelconque des revendications 6 à 19.

21. Colle biologique comprenant le concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou obtenue selon le procédé de l'une quelconque des revendications 6 à 19.

22. Installation pour la préparation d'un concentré de fibrinogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, d'une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou d'une colle biologique selon les revendications 20 et 21, caractérisé en ce qu'elle comporte un dispositif (3) assurant une inactivation virale de la fraction solubilisée de plasma contenant du fibrinogène selon le procédé de l'une quelconque des revendications 14 et 15.

23. Installation selon la revendication 22, caractérisée en ce que le dispositif comporte un émetteur de rayons UVC dont la longueur d'onde est comprise entre 250 et 270 nm, de préférence de l'ordre de 254 nm, à des doses d'irradiation de l'ordre de 250 Joules/m<sup>2</sup>.



1/3

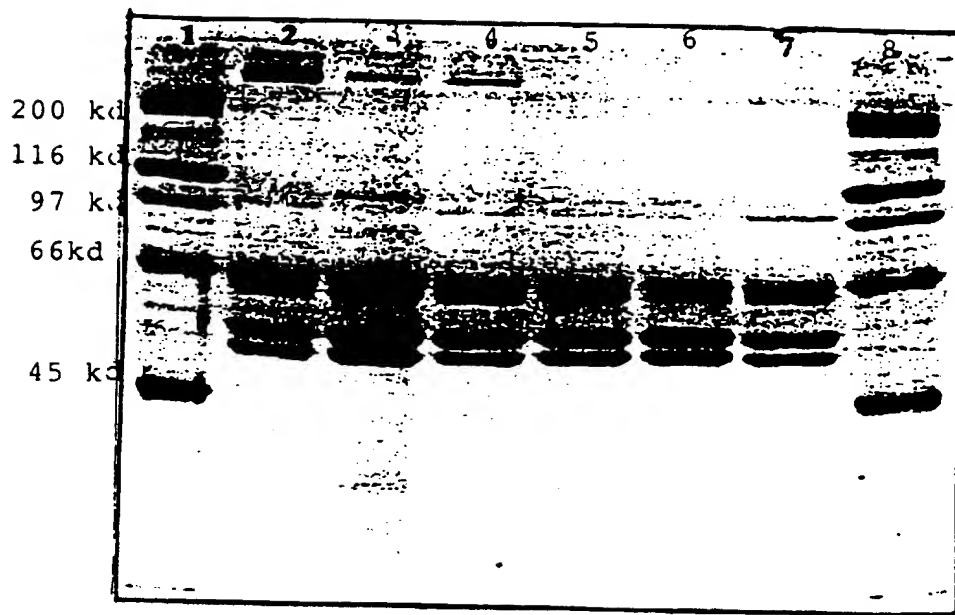


FIG. 1

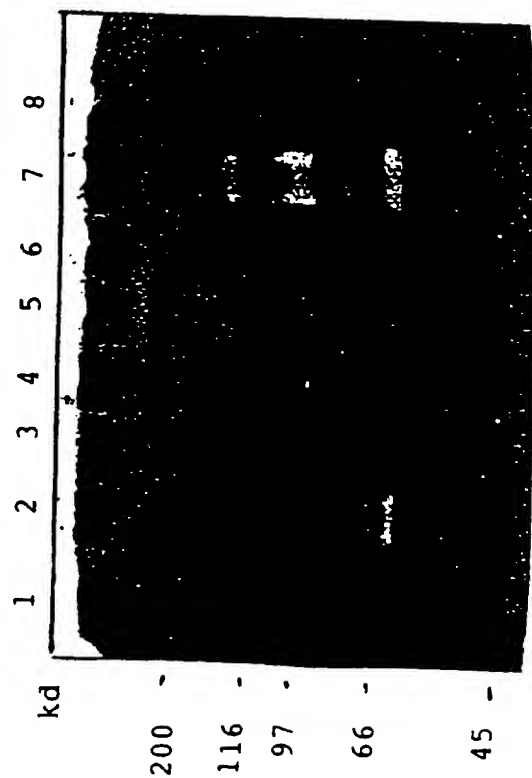


FIG. 2

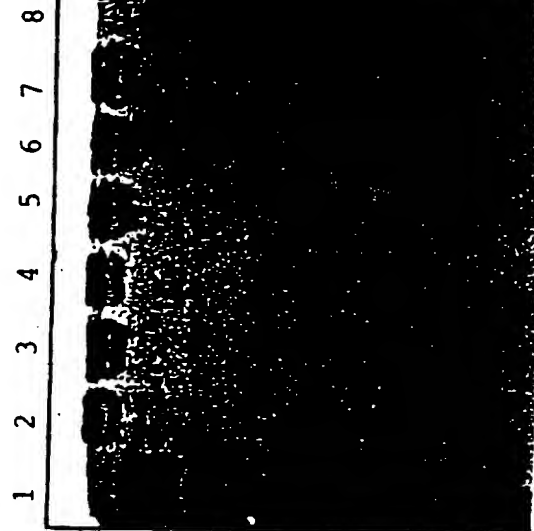


FIG. 3

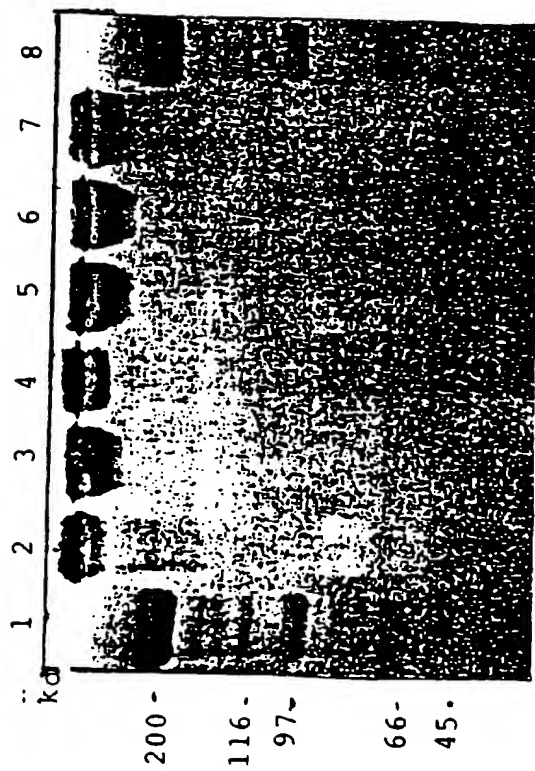


FIG. 4

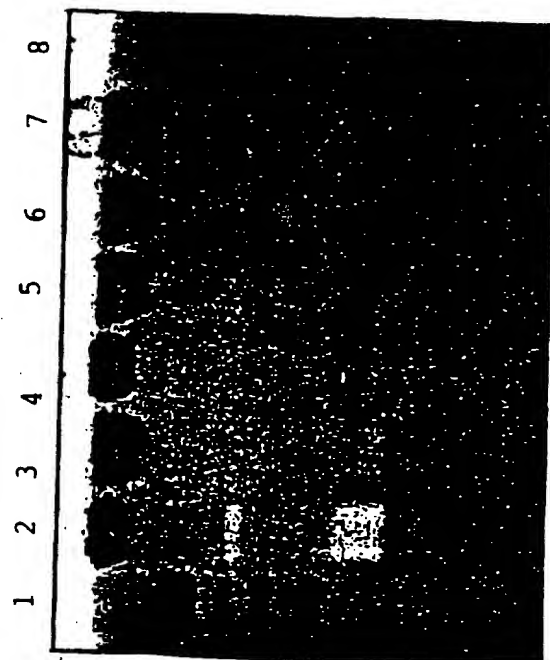
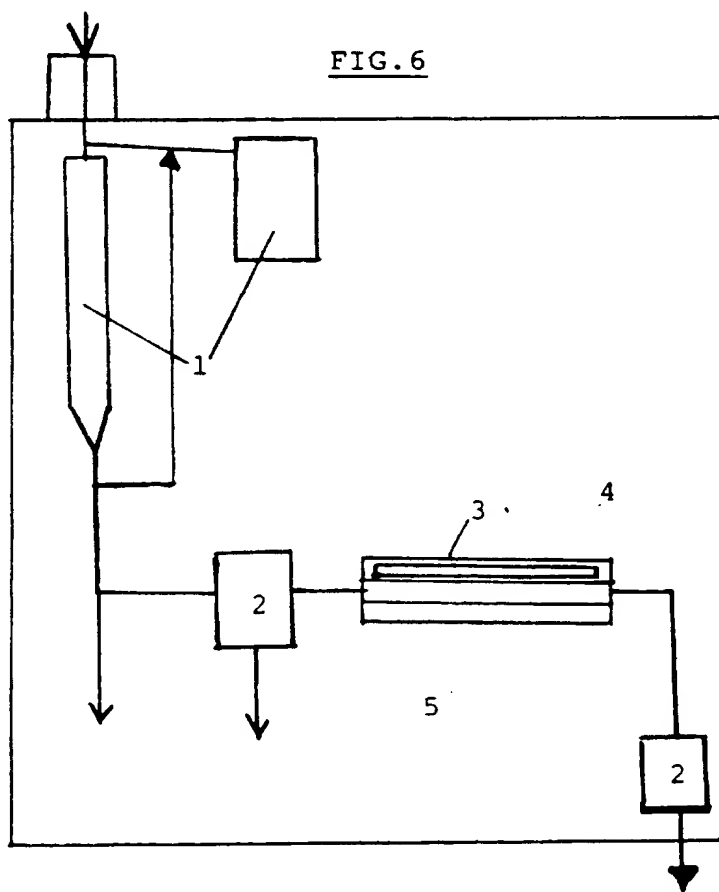


FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/BE 95/00069

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/75 A61L2/18 A61K38/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 018 561 (BEHRINGWERKE AKTIENGESSELLSCHAFT) 12 November 1980 see the whole document ---	1-23
X	DE,A,30 01 435 (MEITO SANGYO) 24 July 1980 cited in the application see the whole document ---	1-23
X	EP,A,0 311 950 (BIOTEST PHARMA GMBH) 19 April 1989 cited in the application see the whole document ---	1-23
X	WO,A,89 12065 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 14 December 1989 cited in the application see the whole document ---	1-10
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 1995

Date of mailing of the international search report

05.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/BE 95/00069

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,86 05190 (CENTRAL BLOOD LABORATORIES AUTHORITY) 12 September 1986 cited in the application see the whole document ---	1-23
A	EP,A,0 555 135 (ASSOCIATION D'AQUITAINE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TRANSFUSION SAN...) 11 August 1993 see the whole document ---	1-23
A	EP,A,0 131 740 (NEW YORK BLOOD CENTER) 23 January 1985 cited in the application see the whole document ---	1-23
A	WO,A,93 05067 (BAXTER INTERNATIONAL) 18 March 1993 see page 32 - page 39 -----	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 95/00069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0018561	12-11-80	DE-A- 2916711	06-11-80
		JP-C- 1693440	17-09-92
		JP-A- 55145615	13-11-80
		JP-B- 62054286	13-11-87
		US-A- 4297344	27-10-81
-----			
DE-A-3001435	24-07-80	JP-B- 1020385	17-04-89
		JP-C- 1535457	21-12-89
		JP-A- 55098196	25-07-80
		US-A- 4295855	20-10-81
-----			
EP-A-0311950	19-04-89	DE-C- 3734923	26-01-89
		JP-A- 1143835	06-06-89
		US-A- 5099003	24-03-92
-----			
WO-A-8912065	14-12-89	FR-A- 2632309	08-12-89
		AT-T- 121750	15-05-95
		AU-B- 1138392	14-05-92
		AU-B- 622436	09-04-92
		AU-B- 3068289	05-01-90
		DE-D- 68922358	01-06-95
		DE-T- 68922358	12-10-95
		EP-A- 0359593	21-03-90
		ES-T- 2070919	16-06-95
		JP-T- 3501974	09-05-91
		NO-B- 177188	24-04-95
		SU-A- 1837880	30-08-93
		US-A- 5252709	12-10-93
-----			
WO-A-8605190	12-09-86	AU-B- 590546	09-11-89
		AU-B- 5543586	24-09-86
		EP-A, B 0215050	25-03-87
		GB-A, B 2172000	10-09-86
		JP-T- 62502116	20-08-87
		US-A- 4789733	06-12-88
-----			
EP-A-0555135	11-08-93	FR-A- 2686883	06-08-93
		DE-T- 555135	31-03-94
		ES-T- 2049701	01-05-94
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 95/00069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0131740	23-01-85	US-A- 4540573	10-09-85
		AU-B- 563925	30-07-87
		AU-B- 3050384	17-01-85
		CA-A- 1221910	19-05-87
		JP-B- 6102627	14-12-94
		JP-A- 60051116	22-03-85
		US-A- 4764369	16-08-88
		US-A- 4820805	11-04-89
WO-A-9305067	18-03-93	AU-A- 2577992	05-04-93
		CA-A- 2117058	18-03-93
		EP-A- 0602173	22-06-94
		JP-T- 7501517	16-02-95

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D    ide Internationale No  
PCT/BE 95/00069

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6    C07K14/75    A61L2/18    A61K38/36

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6    C07K    A61L    A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 018 561 (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT) 12 Novembre 1980 voir le document en entier ---	1-23
X	DE,A,30 01 435 (MEITO SANGYO) 24 Juillet 1980 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
X	EP,A,0 311 950 (BIOTEST PHARMA GMBH) 19 Avril 1989 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C 1de Internationale No  
PCT/BE 95/00069

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,89 12065 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 14 Décembre 1989 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-10
X	WO,A,86 05190 (CENTRAL BLOOD LABORATORIES AUTHORITY) 12 Septembre 1986 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
A	EP,A,0 555 135 (ASSOCIATION D'AQUITAINE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TRANSFUSION SAN...) 11 Août 1993 voir le document en entier ---	1-23
A	EP,A,0 131 740 (NEW YORK BLOOD CENTER) 23 Janvier 1985 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
A	WO,A,93 05067 (BAXTER INTERNATIONAL) 18 Mars 1993 voir page 32 - page 39 -----	1-23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Indice Internationale No  
PCT/BE 95/00069

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0018561	12-11-80	DE-A- 2916711	06-11-80
		JP-C- 1693440	17-09-92
		JP-A- 55145615	13-11-80
		JP-B- 62054286	13-11-87
		US-A- 4297344	27-10-81
DE-A-3001435	24-07-80	JP-B- 1020385	17-04-89
		JP-C- 1535457	21-12-89
		JP-A- 55098196	25-07-80
		US-A- 4295855	20-10-81
EP-A-0311950	19-04-89	DE-C- 3734923	26-01-89
		JP-A- 1143835	06-06-89
		US-A- 5099003	24-03-92
WO-A-8912065	14-12-89	FR-A- 2632309	08-12-89
		AT-T- 121750	15-05-95
		AU-B- 1138392	14-05-92
		AU-B- 622436	09-04-92
		AU-B- 3068289	05-01-90
		DE-D- 68922358	01-06-95
		DE-T- 68922358	12-10-95
		EP-A- 0359593	21-03-90
		ES-T- 2070919	16-06-95
		JP-T- 3501974	09-05-91
		NO-B- 177188	24-04-95
		SU-A- 1837880	30-08-93
		US-A- 5252709	12-10-93
WO-A-8605190	12-09-86	AU-B- 590546	09-11-89
		AU-B- 5543586	24-09-86
		EP-A, B 0215050	25-03-87
		GB-A, B 2172000	10-09-86
		JP-T- 62502116	20-08-87
		US-A- 4789733	06-12-88
EP-A-0555135	11-08-93	FR-A- 2686883	06-08-93
		DE-T- 555135	31-03-94
		ES-T- 2049701	01-05-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Inde Internationale No  
PCT/BE 95/00069

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0131740	23-01-85	US-A- 4540573	10-09-85
		AU-B- 563925	30-07-87
		AU-B- 3050384	17-01-85
		CA-A- 1221910	19-05-87
		JP-B- 6102627	14-12-94
		JP-A- 60051116	22-03-85
		US-A- 4764369	16-08-88
		US-A- 4820805	11-04-89
WO-A-9305067	18-03-93	AU-A- 2577992	05-04-93
		CA-A- 2117058	18-03-93
		EP-A- 0602173	22-06-94
		JP-T- 7501517	16-02-95

